
Desenvolvimento de novas opções terapêuticas na Doença Celíaca: potenciais alternativas à dieta sem glúten

Revisão Bibliográfica

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina submetida
ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto
Ano letivo 2015/2016

Autor: Catarina Sofia Serrasqueiro Teixeira

Aluna do 6.º ano Profissionalizante do Mestrado Integrado em Medicina

e-mail: catarinateixeira60@gmail.com

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Endereço: Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228, 4050-313 Porto

Orientador: Prof. Doutor Fernando Manuel de Castro Poças

Assistente Hospitalar Graduado de Gastrenterologia e Professor Auxiliar com Agregação do
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Afiliação: Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar do Porto e Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Co-orientador: Dr. Tarcísio Pedro Meireles de Araújo

Interno de formação específica em Gastrenterologia

Afiliação: Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar do Porto

Porto, Junho de 2016

Agradecimentos

Ao orientador, Professor Doutor Fernando Castro Poças, pela disponibilidade, orientação e atenção prestadas.

Ao co-orientador, Dr. Tarcísio de Araújo, pelo tempo despendido e apoio dado durante a elaboração desta dissertação.

Resumo

A Doença Celíaca é uma doença inflamatória crónica do intestino delgado, induzida pela ingestão do glúten presente no trigo, centeio e cevada, por indivíduos geneticamente suscetíveis. A prevalência desta doença tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos. A realização de uma dieta sem glúten é o único tratamento aprovado e disponível para estes doentes. Ao longo dos últimos anos, algumas limitações deste tratamento conduziram à investigação de novos alvos terapêuticos que constituam alternativas a uma dieta livre de glúten.

Esta revisão teve como objetivos abordar os aspetos fundamentais da fisiopatologia da doença, os problemas associados à realização de uma dieta sem glúten e analisar as novas terapêuticas propostas.

A fisiopatologia da doença celíaca consiste na ocorrência de uma resposta imune envolvendo quer a imunidade adaptativa quer a inata, dependente da interação de genes do HLA de classe II, glúten e fatores ambientais, que culmina com a lesão da mucosa intestinal, na qual ocorre hiperplasia das criptas epiteliais, aumento dos linfócitos intra-epiteliais e atrofia das vilosidades intestinais. Avanços no conhecimento dos mecanismos que estão envolvidos nesta resposta inflamatória têm permitido o desenvolvimento de outras terapêuticas com objetivo de contornar as limitações relacionadas com a dieta sem glúten, nas quais se incluem a incapacidade de controlo da inflamação do intestino delgado e prevenção a longo prazo de complicações da doença num grande número de doentes assim como a fraca adesão à dieta, alterações impostas ao seu estilo de vida e custos associados. Quanto a estas terapêuticas, verificam-se alguns resultados promissores, principalmente como tratamentos adjuvantes à dieta sem glúten, relativamente ao uso de proteases orais que previnam a exposição da mucosa ao glúten e ao uso de moduladores da permeabilidade intestinal. As terapêuticas imunossupressoras com corticosteroides e anticorpos monoclonais também se mostram eficazes no controlo da sintomatologia e da inflamação em casos graves, refratários à dieta sem glúten. No entanto, é necessária a realização de estudos que envolvam um maior número de doentes, de modo a avaliar a segurança e eficácia destas potenciais alternativas para que no futuro possam vir a ser aplicáveis na prática clínica.

Palavras-chave

Doença celíaca, HLA, transglutaminase tecidual, glúten, dieta sem glúten, potenciais alternativas terapêuticas, imunossupressão

Abstract

Celiac disease is an inflammatory chronic small-bowel disorder in genetically susceptible individuals triggered by exposure to gluten present in wheat, rye, and barley. Lifelong adherence to a gluten free diet is the only therapeutic approved and available for patients. However, some issues related to that therapeutic approach lead to the study of new targets and the development of novel alternative treatments or adjunctive therapies to the gluten-free diet.

We intend to review fundamental aspects of celiac disease pathophysiology, the issues related to the gluten free diet and analyze the novel therapies that have been developed and are under investigation.

The celiac disease consists on an immune response involving the innate and adaptive immunity dependent on the interaction between a triad consisting of HLA class II genes, gluten and environmental factors. These processes lead to histologic changes in the intestinal mucosa including crypt hyperplasia, increase in intraepithelial lymphocytes and villous atrophy. Advances in the knowledge of the mechanisms that are involved in inflammatory response have allowed the development of novel therapies in order to overpass the limitations related to the gluten free diet, which are the inability to control the inflammation of the small intestine, and prevent long-term complications in a large number of patients, as well as poor diet adherence, lifestyle restrictions and cost.

These therapies have presented promising results, namely for the enzyme therapy with endoproteases and the modulation of intestinal permeability, notably as adjunctive treatments to the gluten-free diet. Immunosuppressive therapies with glucocorticoids and monoclonal antibodies have showed efficacy in symptomatic and inflammation control in severely ill patients, refractory to the gluten-free diet. However, it is necessary to develop more studies involving a larger number of patients to further evaluate the safety and effectiveness of these potential alternatives so they may be appropriate to clinical use in the future.

Key-words

Celiac disease, HLA, tissue transglutaminase, gluten, gluten-free diet, novel therapies, immunosuppression

Índice

1. Lista de abreviaturas.....	6
2. Introdução	7
3. Material e Métodos.....	9
4. Desenvolvimento.....	9
4.1. Fisiopatologia da Doença Celíaca	9
4.2. Tratamento da Doença Celíaca.....	13
4.2.1. Dieta Sem Glúten.....	13
4.2.2. Novas terapêuticas na Doença Celíaca.....	15
4.2.2.1. Terapêuticas intraluminais	16
4.2.2.2. Modulação da permeabilidade intestinal.....	18
4.2.2.3. Atenuação da resposta imune adaptativa	19
4.2.2.4. Moduladores da resposta imune.....	20
4.2.2.5. Controlo da resposta imune	22
5. Conclusão	26
6. Referências Bibliográficas.....	28

1. Lista de abreviaturas

Anti-tTG – anticorpos contra a Transglutaminase Tecidual
Anti-gliadina – anticorpos contra a fração de gliadina do glúten
APC – sigla inglesa Antigen Presenting Cell
Células NK – Células Natural Killer
DC – Doença celíaca
DAI – Doenças Auto-imunes
DCR – Doença Celíaca Refratária
DII – Doença Inflamatória Intestinal
DSG – Dieta Sem Glúten
EALT – Enteropatia Associada ao Linfoma de células T
EDA – Endoscopia Digestiva Alta
FDA – sigla inglesa Food and Drug Administration (USA)
GI - Gastrointestinal
HLA – sigla inglesa Human Leukocyte Antigen
IFN- γ – Interferão γ
IgA – Imunoglobulina do isótipo A
IL-15 – Interleucina 15
LIE – Linfócitos intra-epiteliais
LNH – Linfoma Não Hodgkin
LP – Lâmina Própria
MEC – Matriz Extracelular
MIC-A – Polipéptido relacionado com HLA de classe I de sequência A
MIC-B - Polipéptido relacionado com HLA de classe I de sequência B
mRNA – RNA mensageiro
PEP – Prolil endopeptidases
PEP-AN – Prolil endopeptidase derivada de *Aspergillus niger*
Th – Células T helper
TCR – Recetor expresso pelos linfócitos T
TJ – sigla inglesa *Tight Junction*
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
Treg – células T reguladoras
tTG – Transglutaminase Tecidual
ZOT – Toxina da *zonula occludens*

2. Introdução

A Doença Celíaca (DC) é uma doença inflamatória crônica do intestino delgado, induzida pela ingestão do glúten presente no trigo, centeio e cevada, por indivíduos geneticamente suscetíveis (1). Estima-se que atualmente a DC afete 1% da população geral, podendo ser diagnosticada em qualquer idade. É mais frequente nos países ocidentais assim como no Norte de África, Médio Oriente e Índia (2). Diversos estudos sugerem um aumento da sua prevalência ao longo do tempo e embora a sua causa seja desconhecida, estes apontam para a influência de fatores ambientais, uma vez que se trata de um curto espaço temporal para ocorrerem alterações genéticas que justifiquem uma maior prevalência da doença (2-4).

A patogénese da DC depende da interação entre uma tríade composta por genes, glúten e fatores ambientais, na sequência da qual se desenvolve uma resposta imune, que culmina com a lesão da mucosa do intestino delgado (5). Estudos de *linkage* genético revelaram que a doença apresenta uma forte associação com genes do Antígeno Leucocitário Humano de classe II (HLA), que codificam parte de um recetor celular expresso pelas células apresentadoras de antígenos (APC). Assim, a suscetibilidade genética está associada aos genes DQ do HLA (HLA-DQA1 e HLA-DQB1), pois a maioria dos doentes apresenta a variante DQ2, constituída pela combinação de alelos DQA1*05/DQB1*02, e os restantes a variante DQ8, com os alelos DQA1*03/DQB1*0302 (1, 6).

O glúten, no contexto da DC, compreende a fração proteica presente nos grãos dos cereais que causam esta patologia, que sofre hidrólise incompleta no trato gastrointestinal (7). Nos indivíduos com DC, os péptidos resultantes da digestão incompleta do glúten, atravessam a barreira epitelial e alcançam as APC presentes na lâmina própria (LP). A ligação destes péptidos às moléculas de HLA presentes nas APC resulta na formação de complexos peptídicos que ativam células TCD4⁺ específicas para o glúten presentes na LP. Esta ligação é precedida pela desaminação dos resíduos de glutamina mediada pela transglutaminase tecidual (tTG), processo que confere uma maior afinidade para a ligação com as moléculas do HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (1, 3, 7, 8). As células TCD4⁺ reativas ao glúten produzem diversas citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam mecanismos que levam ao aumento da apoptose dos enterócitos, atrofia das vilosidades intestinais, hiperplasia das criptas, infiltração de células inflamatórias no epitélio e na LP do intestino delgado (7) e à estimulação da produção de anticorpos anti-gliadinas e anti-tTG pelas células B (1, 8).

A apresentação clínica nos adultos com DC é muito variável e inclui sintomas de síndrome mal-absortiva, presença de manifestações extra-intestinais e a possibilidade de ausência de qualquer queixa (1). Verifica-se uma prevalência aumentada de doenças auto-

imunes (DAI) em relação à população geral, que se relaciona com a duração da exposição ao glúten e, de forma semelhante, a sintomatologia associada e os níveis de auto-anticorpos podem melhorar nalgumas destas patologias com a eliminação da exposição ao glúten (3, 9, 10). De acordo com *guidelines* disponíveis, o diagnóstico é feito quando os doentes apresentam serologias positivas com títulos de anticorpos anti-tTG e se obtêm biópsias duodenais através da realização de endoscopia digestiva alta (EDA). A presença de alterações histológicas, atrofia das vilosidades e infiltração linfocitária intra-epitelial, juntamente com dados da história clínica, exame físico e serológicos confirmam o diagnóstico (11).

Os doentes celíacos apresentam um risco aumentado de desenvolver linfoma Não-Hodgkin (LNH) e adenocarcinoma do trato gastrointestinal. Quanto ao LNH verifica-se que na DC existe um maior risco relativo de LNH de células T. Nomeadamente, de uma forma rara de LNH de células T de alto grau do intestino delgado proximal com associação específica à DC, enteropatia associada ao linfoma de células T (EALT). A instituição e adesão a uma DSG precoce parecem exercer um efeito protetor relativamente ao risco de desenvolvimento de neoplasias malignas, com exceção do LNH e da EALT (12-14).

O único tratamento efetivo aprovado para a DC é a adesão a uma dieta sem glúten (DSG) ao longo de toda a vida, o que implica a eliminação de todas as fontes de glúten da dieta (11, 15). Na maioria dos doentes, a introdução da DSG possibilita a resolução dos sintomas, a recuperação da mucosa intestinal e normalização dos auto-anticorpos. Contudo, não é claro em que extensão ocorre a completa normalização histológica das biópsias do intestino delgado, pois alguns estudos evidenciam que a mesma não é atingida num número substancial de doentes, apesar da realização de uma dieta estrita e da remissão sintomática e serológica (16-18). Um subgrupo de doentes pode ter persistência ou recorrência dos sintomas, inflamação intestinal e atrofia das vilosidades intestinais apesar da adesão a uma DSG estrita. Esta entidade define-se como doença celíaca refratária (DCR) e caracteriza-se pela presença destas alterações durante pelo menos 12 meses apesar da realização de uma DSG, na ausência de outras causas que causem atrofia das vilosidades intestinais (19). Outras limitações relacionadas com esta terapêutica crónica são a contaminação de alimentos com quantidades vestigiais de glúten que leva à recorrência dos sintomas em alguns doentes, o custo financeiro das alternativas sem glúten e a *compliance* rigorosa que esta terapêutica exige face às pressões sociais e limitações da vida diária a que estão sujeitos, dificultando o seu cumprimento (18, 20, 21). Por último, estudos de avaliação da qualidade de vida destes doentes revelam uma degradação da mesma, anos após o diagnóstico, em comparação com a população-geral (22, 23). A constatação destes problemas relacionados com a DSG e avanços no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à DC permitiu a

investigação e desenvolvimento de outras possibilidades terapêuticas. Deste modo, são exemplos de terapêuticas em desenvolvimento a diminuição da permeabilidade intestinal pelo bloqueio de recetores nas *tigh-junction* epiteliais, degradação dos péptidos de gliadina por proteases orais, indução de tolerância ao glúten com a administração de vacinas e controlo da resposta imune, com o uso de corticosteroides e de anticorpos monoclonais. Tendo em conta que a maioria destas terapêuticas ainda se encontra apenas na fase pré-clínica e as restantes na fase I e na fase II dos ensaios clínicos, ainda não estão disponíveis na prática clínica e as suas recomendações estão em progresso (6, 24, 25).

A presente revisão bibliográfica tem como principais objetivos abordar os aspetos fundamentais sobre a fisiopatologia da DC, os problemas associados à realização da DSG e analisar as novas terapêuticas propostas, as suas características, o seu fundamento e potencial como alternativas à DSG.

3. Material e Métodos

Para a realização desta revisão bibliográfica foi efetuada a pesquisa de artigos científicos na base *MEDLINE – Pubmed* na qual se utilizaram as palavras-chave “celiac disease”, “physiopathology”, “drug therapy”, “novel therapies”, “gluten free diet”. Outros artigos foram adicionados utilizando a opção “Related articles”. Foram selecionados e analisados 99 artigos em língua inglesa publicados desde o ano 2000 até ao ano 2015, que se enquadravam no âmbito desta revisão.

4. Desenvolvimento

4.1. Fisiopatologia da Doença Celíaca

O glúten é constituído por prolaminas e gluteninas, proteínas que participam na lesão da mucosa intestinal da DC. As prolaminas presentes no trigo são designadas de gliadinas, proteínas de composição semelhante estão presentes na cevada e no centeio (1). Os péptidos de gliadina permanecem no lúmen intestinal após a ingestão de glúten, por serem resistentes à degradação pelas proteases. Apesar de todos estes péptidos não completamente hidrolisados serem imunoestimuladores, uns são mais potentes que outros. Destaca-se um péptido de 33 aminoácidos (33-mer) identificado numa das frações da gliadina cujas propriedades funcionais são atribuídas ao seu conteúdo em sequências repetitivas e ricas em prolina e glutamina. Enquanto os resíduos de prolina conferem ao péptido um aumento da resistência à proteólise gastrointestinal e causam uma alteração na conformação que torna a ligação às moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 mais forte, os resíduos de glutamina constituem o substrato para a desaminação pela tTG processo que confere um aumento na imunogenicidade (1, 7).

Na DC verifica-se um aumento da permeabilidade intestinal que torna possível que os péptidos imunogénicos alcancem a LP, contudo o mecanismo subjacente permanece controverso. Uma hipótese proposta para a permeabilidade aumentada na DC baseia-se na existência da zonulina, uma proteína relacionada com as *tigh junction* (TJ) e que tem sido implicada no aumento da permeabilidade intestinal. Estudos realizados *in vitro* e *ex vivo* concluíram que mediante a exposição das células epiteliais intestinais aos péptidos de gliadina e a subsequente interação destes com o recetor de quimiocinas CXCR3 ocorre libertação de zonulina em indivíduos com DC. Esta, por sua vez, ativa vias de sinalização intracelular e conduz à reorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto mediada pela proteína cinase C, com desarranjo estrutural das TJ, possibilitando o transporte paracelular (26-28). Contudo, existem ambiguidades relativamente a este tipo de transporte dos péptidos de gliadina na DC.

Na LP, os péptidos de gliadina encontram a enzima tTG que catalisa a desaminação dos seus resíduos de glutamina, tornando-os mais eficientes como péptidos imunogénicos (29). A tTG é uma enzima que se distribui ubiquitariamente no organismo, podendo localizar-se intracelularmente, onde se pensa ter um papel na apoptose. Porém, também se pode localizar na matriz extracelular (MEC), ligando-se á fibronectina e exercendo um papel importante na sua estabilização. A sua libertação aumenta perante fenómenos de cicatrização, angiogénese e stress mecânico (29-31). Dada a reação de modificação dos péptidos de glúten presume-se que a patogénese da DC dependa da atividade extracelular desta enzima. Devido ao seu alto conteúdo em glutamina, as gliadinas representam o substrato dador preferencial da tTG. Neste sentido, esta enzima catalisa a desaminação altamente seletiva destes aminoácidos presentes em sequências específicas. Este processo conduz à transformação destes resíduos em ácido glutâmico, com introdução de cargas elétricas negativas em localizações específicas do péptido que passam a constituir resíduos âncora para a ligação preferencial de moléculas do HLA (29, 30, 32). Para além da ligação preferencial pelo HLA, as células T na DC reconhecem com maior eficiência os epítomos que sofreram desaminação do que os nativos (32). Outro tipo de reação enzimática da tTG é a transaminação com formação de ligações cruzadas entre proteínas. A tTG apresenta a capacidade de catalisar esta reação entre os péptidos de gliadina e proteínas da MEC bem como com a própria enzima. Estas últimas parecem possibilitar a formação de haptenos entre a gliadina e tTG na LP possibilitando uma resposta imune com produção de anticorpos contra a gliadina e a tTG, o que pode explicar o aparecimento de auto-anticorpos dirigidos à tTG nestes doentes (29, 33-35).

A resposta imune é iniciada no tecido linfoide organizado do trato GI quando as APC que expressam HLA-DQ2/DQ8 apresentam os péptidos de glúten às células TCD4⁺ naïve conduzindo à sua ativação e diferenciação em células do tipo Th1. Após a sua ativação, as

células TCD4⁺ reativas ao glúten regressam à LP via corrente sanguínea, onde são reativadas pelas APC residentes no local (36-38). Estas células TCD4⁺ efectoras produzem grandes quantidades de Interferão γ (IFN- γ), verificando-se que a expressão de RNA mensageiro para o IFN- γ se encontra aumentada relativamente à expressão do mRNA de outras citocinas também produzidas na resposta do tipo Th1 como IL-2, IL-18 e TNF- α . A ligação do IFN- γ ao seu recetor promove a transcrição de genes relacionados com a inflamação, contribuindo assim para a resposta inflamatória local na DC e para a sua manutenção. Existem evidências de que o IFN- γ induz a secreção de metaloproteínases a partir dos fibroblastos, com consequente degradação dos componentes da MEC. Esta citocina também potencia a citotoxicidade dos LIE, aumentando a apoptose dos enterócitos e destruição das vilosidades (36, 39, 40).

Na DC não tratada, ocorrem infiltrados linfocitários epiteliais constituídos maioritariamente por células TCD8⁺ que expressam TCR $\alpha\beta$ ⁺. (41). A ativação destes LIE e a resposta imune desencadeada também contribuem para a destruição da arquitetura do epitélio intestinal. As hipóteses colocadas sobre a especificidade antigénica dos linfócitos TCD8⁺ e os mecanismos que levam à sua ativação e expansão na mucosa intestinal não são consensuais. Estudos desenvolvidos que avaliaram a especificidade antigénica das células TCD8⁺ identificaram um péptido derivado da gliadina restrito ao HLA de classe I reconhecido seletivamente por linfócitos TCD8⁺ (42, 43), porém evidências mais recentes referem que não existe associação genética significativa entre a DC e alelos da classe I do HLA, pelo que na generalidade é aceite que os LIE não levam à lesão intestinal através do reconhecimento de epítomos derivados do glúten (41, 44). Consequentemente estabeleceu-se a hipótese de que os linfócitos TCD8⁺ conduzam à morte dos enterócitos através do reconhecimento de moléculas indutoras de *stress* e sinais inflamatórios exercendo a sua atividade citolítica independentemente da especificidade do TCR mediante ativação por estes sinais (41).

Nos indivíduos saudáveis, os linfócitos TCD8⁺ presentes no epitélio expressam um recetor inibitório CD94-NKG2A e baixos níveis do recetores ativadores NKG2D e CD94-NKG2C. Os LIE dos doentes celíacos perdem a expressão do recetor inibitório e adquirem altos níveis de expressão do recetor NKG2D e CD94-NKG2C. Simultaneamente, as células epiteliais intestinais têm uma expressão aumentada dos ligandos destes recetores, as moléculas MIC-A/MIC-B e HLA-E, respetivamente (45). Estas moléculas constituem sinais de *stress* expressos pelos enterócitos quando expostos ao glúten, a condições inflamatórias ou infecciosas e o reconhecimento destes ligandos pelos LIE conduz à destruição epitelial (46).

A interleucina 15 (IL-15) é uma citocina pró-inflamatória que tem a capacidade de ativar e recrutar linfócitos TCD8⁺ que induzem a morte dos enterócitos, desempenhando um papel

importante na fisiopatologia da DC. A IL-15 é expressa na superfície celular quando as células se encontram sob condições de inflamação e *stress* e surge tipicamente associada ao sistema imune inato. Na DC, a sua libertação é estimulada pela ingestão de glúten e encontra-se desregulada, com consequente elevação dos seus níveis na LP e no epitélio intestinal. Na LP, a IL-15 é produzida pelas células mononucleares e parece estar envolvida na polarização das células TCD4⁺ para uma resposta do tipo Th1 assim como na perda de tolerância ao glúten (47). No epitélio intestinal, a IL-15 é produzida pelas células epiteliais e atua nos LIE induzindo a ativação de vias de sinalização e alteração das funções dos linfócitos, através da regulação positiva da expressão do recetor NKG2D e co-estimulação das vias citotóxicas a ele associadas. Desta forma, a ativação dos linfócitos TCD8⁺ é mediada pela indução da expressão do recetor NKG2D e outros recetores NK presentes nestas células, pelo que os LIE sofrem alterações passando de linfócitos antigénio-específicos para células semelhantes a células NK capazes da indução da apoptose dos enterócitos. Adicionalmente, a IL-15 induz a expressão de moléculas anti-apoptóticas pelos LIE o que pode contribuir para a sua expansão clonal e sobrevivência prolongada (46, 48).

Relativamente à resposta imune humoral, estes doentes produzem anticorpos específicos para o glúten e para a tTG que estão presentes no soro e em depósitos na mucosa intestinal. Estes anticorpos são libertados localmente pelos plasmócitos presentes na LP, cuja expansão clonal também é uma característica da DC ativa (49). Aspectos comuns entre os anticorpos dirigidos à tTG e ao glúten e a flutuação dos seus títulos em resposta ao glúten presente na dieta sugerem que estas duas respostas imunes humorais se desenvolvem de forma semelhante. A dependência da ingestão de glúten e o facto da existência exclusiva destes anticorpos em indivíduos portadores dos alelos HLA-DQ2/DQ8 apontam para a participação de células T reativas ao glúten na ativação das células B. Os linfócitos B, que funcionam como APC específicas para o glúten reconhecem preferencialmente resíduos desaminados e epítomos sobreponíveis ou de localização próxima aos epítomos reconhecidos pelas células TCD4⁺. Assim, o repertório de células B reativas parece ser idealmente selecionado com a finalidade de receber apoio das células T na sua ativação com consequente produção de anticorpos anti-glúten. O modo como os linfócitos T específicos para o glúten intervêm na produção de células B seletivas para a tTG é menos óbvio. Um dos modelos propostos estabelece que células B auto-reativas internalizam os complexos formados pela tTG e péptidos de glúten, o que permite a ajuda intermolecular das células T específicas para o glúten conduzindo a uma resposta imune anti-tTG, com produção de anticorpos na ausência de células T específicas para a enzima. Apesar destes anticorpos serem um marcador confiável de diagnóstico na DC, a possibilidade de desempenharem um papel na fisiopatologia da doença é controverso (33, 49).

A perda de tolerância oral ao glúten pressupõe que esta se tenha degradado ou nunca se tenha desenvolvido nestes doentes. Diversos conjuntos de células T reguladoras (Treg) estão envolvidas na tolerância imune, dos quais se destacam as células que expressam o fator de transcrição Foxp3 (39). Estudos observaram que na mucosa intestinal na doença não tratada, a par da produção de altos níveis de IFN- γ são produzidas grandes quantidades da citocina anti-inflamatória IL-10. Contudo, a proporção IL-10/ IFN- γ é significativamente baixa quando comparada com a proporção dos níveis destas citocinas, nos controlos e em indivíduos numa DSG sem lesões da mucosa intestinal. Este resultado é sugestivo de que níveis elevados de IL-10 refletem uma via anti-inflamatória compensatória que tenta neutralizar os estímulos pró-inflamatórios durante a DC ativa, porém não é suficiente para suprimir a resposta do tipo Th1, desconhecendo-se as razões da ineficácia desta via (39, 50, 51). Relativamente à supressão da resposta imune, diversos estudos identificaram um aumento significativo do número das células Treg Foxp3⁺ na LP na doença ativa, o que pode representar uma tentativa do sistema imune em controlar o início da inflamação. Embora estas células sejam funcionalmente ativas, têm a sua capacidade de supressão imune regulada negativamente por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-15 (50, 51). O efeito deletério da IL-15 na tolerância imune ocorre através do seu efeito inibidor da sinalização pelo TGF- β , necessária para manter as células Treg e sustentar suas as funções imunossupressoras bem como a expressão o Foxp3 nestas células. Por outro lado, a IL-15 torna a as células T efectoras resistentes à supressão pelas células Treg (52, 53).

4.2. Tratamento da Doença Celíaca

4.2.1. Dieta Sem Glúten

Atualmente o único tratamento disponível e aprovado para a DC é a realização, ao longo de toda a vida, de uma dieta isenta de glúten. Esta dieta implica a evicção de todos os alimentos e fármacos que contenham glúten (trigo, cevada, centeio e os seus derivados) (11). A adoção deste tratamento conduz a uma rápida e substancial melhoria dos sintomas, mesmo nos indivíduos gravemente doentes (54). De forma semelhante regista-se uma diminuição dos títulos de auto-anticorpos da DC, uma vez que estes marcadores serológicos são dependentes da exposição ao glúten. Contudo, esta remissão serológica não se correlaciona com o grau de lesão da mucosa intestinal, pelo que a seroconversão obtida após o início da DSG não implica a sua ausência. A recuperação histológica ocorre de forma mais lenta, levando meses a anos, e apesar de se verificar uma melhoria nas alterações da mucosa associadas à DC, num grande número de doentes não é atingida uma completa normalização histológica (11, 55). Benefícios terapêuticos adicionais da eliminação do glúten da dieta na DC passam pela prevenção a longo prazo do desenvolvimento de neoplasias, osteoporose e DAI, com consequente diminuição do risco de mortalidade global (11, 13, 56).

Embora a DSG seja segura e efetiva, ocorrendo uma melhoria clínica na maioria dos doentes, existem algumas limitações associadas a esta terapêutica (tabela I). Como referido anteriormente, a extensão da recuperação da mucosa refletida pela melhoria histológica é variável. Estudos evidenciam que a completa normalização histológica das biópsias do intestino delgado está ausente num grande número de doentes, apesar da realização de uma dieta estrita e da remissão sintomática e serológica (16, 17, 57). Rubio-Tapia et al (2010) realizaram um estudo retrospectivo com 381 doentes celíacos com o objetivo de estimar a taxa de recuperação da mucosa e avaliar as implicações clínicas da persistência do dano da mucosa após adesão à DSG. Estes autores não verificaram, dois anos após o diagnóstico, a recuperação completa da mucosa numa proporção substancial de adultos. Observaram ainda uma associação entre a recuperação da mucosa e redução na mortalidade, tendo em conta que os doentes com normalização histológica após o tratamento apresentaram um menor risco de mortalidade comparativamente aos doentes com lesão permanente da mucosa. Nestes últimos as causas de mortalidade relacionavam-se com complicações da DC (16).

A manutenção de uma dieta com eliminação absoluta do glúten é difícil. A contaminação com glúten dos alimentos é bastante comum, mesmo naqueles produzidos especificamente para o tratamento dietético da DC. As consequências da exposição a quantidades mínimas de glúten não são lineares, existindo uma acentuada variabilidade na sensibilidade dos diferentes indivíduos ao glúten, sendo que uma exposição mínima pode levar à recorrência dos sintomas e das alterações da mucosa intestinal em alguns doentes (20, 23). Por outro lado, considerando que a DSG tem de ser realizada de forma crónica e a distribuição praticamente universal do glúten nos alimentos, esta terapêutica para além de ser restritiva e ter impacto no consumo alimentar, também afeta o estilo de vida destes indivíduos (21). Assim, a DSG exige uma *compliance* rigorosa pelos doentes, pelo que pressões sociais e limitações impostas pela vida diária podem contribuir para uma diminuição do cumprimento da mesma (21). Estudos descreveram um aumento na qualidade de vida dos doentes celíacos quando iniciaram uma DSG principalmente se sintomáticos ao diagnóstico. Contudo, esta melhoria da qualidade de vida regista uma degradação significativa após o primeiro ano não ocorrendo um aumento simultâneo da perceção dos sintomas da DC. Anos após o diagnóstico e instituição de uma DSG, a diminuição da qualidade de vida é evidente em comparação aos controlos saudáveis. Estes resultados sugerem que a qualidade de vida destes doentes não atinge os mesmos níveis de qualidade de vida da população geral saudável a longo prazo, havendo ainda uma degradação da mesma ao longo do tempo (22, 23).

Nos doentes celíacos, a maioria dos défices nutricionais presentes ao diagnóstico desaparece com uma DSG, após restabelecimento da integridade da mucosa e melhoria da síndrome mal-absortiva. Porém alguns estudos demonstraram que a DSG não garante uma

ingestão nutricional adequada, pelo que foram descritos alguns défices nutricionais relacionados com o tratamento a longo-prazo (15, 58).

Outros doentes apresentam persistência ou recorrência dos sintomas, aparentemente não respondendo à DSG. A contaminação com glúten conduzindo à atrofia das vilosidades é a causa mais frequente da manutenção da sintomatologia, contudo a presença de outra doença intestinal deve ser ponderada. O diagnóstico de DCR é feito após a exclusão de outras causas de atrofia das vilosidades, quando os sintomas persistem apesar de uma DSG rigorosa durante mais de 12 meses, comprovada pela normalização dos títulos de anticorpos. A prevalência da DCR é desconhecida, porém tem uma incidência cumulativa de 0,05% na população geral. Pode ser subdividida em dois tipos, com base na ausência (tipo I) ou presença (tipo II) nas biópsias intestinais de expansão clonal de uma população de linfócitos intra-epiteliais com alto potencial de transformação maligna. Ambos os subtipos diferem na resposta a terapêuticas alternativas e no prognóstico, enquanto o primeiro melhora após o tratamento com suporte nutricional, estabelecimento de uma DSG e terapêutica imunossupressora, na DCR tipo II a resposta ao tratamento com agentes quimioterápicos é menor e o prognóstico é desfavorável (19).

Tabela I – Sistematização de prováveis fatores que contribuem para as limitações associadas com a DSG.

Problema associado à DSG	Fatores contribuintes
Ausência de normalização histológica	Fraca <i>compliance</i> pelos doentes na realização da DSG (16) Exposição inadvertida ao glúten (16) Atrofia total das vilosidades e gravidade da apresentação clínica ao diagnóstico (16)
Défices nutricionais: fibras, folato, niacina e vitamina B12.	Produtos sem glúten não são enriquecidos com estes micro-nutrientes (15, 58) Hábitos alimentares adicionais à DSG excluem as fontes destes nutrientes pelos doentes (15, 58)
Incapacidade na eliminação absoluta do glúten da dieta	Contaminação dos alimentos com glúten Dificuldade na interpretação dos rótulos dos alimentos sem glúten (18) Elevado custo e falta de palatabilidade dos alimentos isentos de glúten (18)
Fraca <i>compliance</i> pelos doentes na realização da DSG	Realização de uma DSG ao longo de toda a vida (21) Dieta restritiva (21) Pressões sociais e limitações impostas pela vida diária (21)

4.2.2. Novas terapêuticas na Doença Celíaca

A observação dos problemas relacionados com a DSG, do risco de morbilidade e de mortalidade associada à exposição contínua ao glúten, conduziu à necessidade de pesquisa de tratamentos alternativos ou adjuvantes à DSG. Mediante o avanço no conhecimento da patogénese da DC foi possível identificar diversos alvos terapêuticos que poderão constituir potenciais alternativas terapêuticas (59). Um fármaco ideal para o tratamento da DC deve ter

como objetivo proporcionar a resolução completa da inflamação observável na biópsia do intestino delgado independentemente da exposição significativa ao glúten (60). Apesar do interesse nos tratamentos alternativos para a DC, apenas algumas terapêuticas experimentais foram estudadas em ensaios clínicos randomizados de fase I e II enquanto a maioria foi estudada em modelos pré-clínicos da DC (tabela II) (60).

Tabela II – Novas terapêuticas na DC. Adaptado de Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1912-33.(61)

Alvo	Fármaco/modificação	Estado de desenvolvimento
Terapêuticas intraluminais		
Ingestão péptidos gliadina	Endopeptidases (PEP)	Fase I
	PEP + EP-B2	Fase II
	Polímeros sequestradores de gliadina	Fase I/Fase II
Uptake transepitelial		
<i>Tight junction</i> epiteliais	Acetato de Larazotide	Fase II
Atenuação da resposta imune adaptativa		
tTG	Inibidores da tTG	Fase pré-clínica
HLA	Bloqueio de análogos DQ2	Fase pré-clínica
Moduladores imunes		
	Parasita <i>Necator americanus</i>	Fase II
	Vacinação	Fase II
	Probióticos	Fase II
Controlo da resposta imune		
Migração células T para a mucosa intestinal	Antagonista CCR9	Fase II
LIE	Antagonista IL-15	Fase pré-clínica
Co-recetor das células T	Anti CD3	Fase pré-clínica
Supressão das células B	Anti CD20	Case reports na DC acompanhada de DAI
Destruição da mucosa intestinal na DCR	Anti-TNF α Anti-IFN γ	Case reports na DC Ensaio clínicos na DII

4.2.2.1. Terapêuticas intraluminais

Proteases orais

O elevado conteúdo do glúten em prolina confere-lhe uma resistência parcial às proteases, pelo que a administração de prolil endopeptidases (PEP) constitui uma estratégia para destoxificação dos péptidos de gliadina, tendo em conta a capacidade destas enzimas em clivar os péptidos através dos resíduos de prolina antes da sua libertação no lúmen intestinal. Como tal, desenvolveram-se PEP recombinantes com capacidade de proteólise dos péptidos de gliadina, a partir das que são expressas em bactérias e fungos (61, 62). PEP derivadas do *Aspergillus niger* (PEP-AN) apresentaram propriedades enzimáticas vantajosas relação às PEP bacterianas como degradação do glúten em menor tempo, atividade em pH baixo e resistência à pepsina gástrica (63). Num modelo *in vitro* observou-se que as PEP-AN degradavam os péptidos tóxicos do glúten em fragmentos não imunogénicos. Num estudo que envolveu 16 adultos com doença controlada e manutenção de uma DSG, numa primeira fase de segurança, foi dada uma dose diária de 7g de glúten juntamente com PEP-AN durante

2 semanas enquanto os indivíduos mantinham a DSG. A endopeptidase foi bem tolerada, os *scores* dos índices de qualidade de vida na DC permaneceram relativamente altos e não foram reportados eventos adversos durante esta fase. Na fase seguinte do estudo, para avaliação de eficácia, 14 dos indivíduos sem deterioração histológica significativa foram sujeitos a um ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, mantendo as condições dietéticas da primeira fase, tendo sido tratados com PEP-AN ou com placebo, consoante o grupo. No final desta fase foram avaliadas as alterações histológicas, os títulos de auto-anticorpos da DC e os *scores* dos índices de qualidade de vida. Em nenhum destes parâmetros clínicos se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de tratamento e o grupo de controlo, não tendo ocorrido deterioração significativa da histologia das biópsias intestinais, dos índices de qualidade de vida nem desenvolvimento de títulos de anticorpos substanciais (64). Encontram-se em curso estudos adicionais para avaliar a eficácia das PEP-AN na degradação do glúten. Assim, o potencial das PEP-AN como agente terapêutico na DC permanece incerto (60).

O elevado conteúdo em glutamina dos péptidos de glúten constitui outro alvo no tratamento com proteases orais, através do uso da EP-B2 cisteína endoprotease derivada da semente de cevada (62). Mais recentemente, uma PEP bacteriana derivada de *Sphingomonas capsulata* (SC-PEP) foi combinada com a EP-B2, originando uma formulação designada por ALV003 (*Alvine Pharmaceuticals*) (63). *In vitro* verificou-se que a EP-B2 é primariamente responsável por hidrolisar os resíduos de glutamina presentes no glúten em oligopéptidos mais curto, mas imunoestimuladores, enquanto a SC-PEP cliva estes oligopéptidos no local dos resíduos de prolina originando produtos não tóxicos. Esta combinação de 1:1 atua de forma sinérgica e estável no ambiente gástrico, mostrando ser mais eficaz do que cada uma destas endopeptidases isoladamente (65). Em dois ensaios clínicos de fase I todas as doses de ALV003 foram toleradas sem efeitos adversos graves e observou-se que esta formulação levou à degradação do glúten com a mesma eficácia que a verificada *in vitro* (66). Num estudo de fase II, duplo-cego, de duração de 6 semanas, a eficácia de ALV003 foi comparada com placebo em 41 doentes portadores da doença, que realizaram uma dieta com glúten. Foram realizadas EDA antes e depois da exposição ao glúten nos indivíduos dos dois grupos, os sintomas e marcadores serológicos também foram avaliados. Nos doentes que receberam ALV003 não ocorreram alterações histológicas, enquanto que no grupo placebo houve um agravamento da proporção altura das vilosidades/profundidade das criptas. De forma semelhante, a densidade dos LIE também aumentou naquele grupo. Não se observaram diferenças entre os grupos relativamente aos sintomas e títulos de anticorpos. Estes resultados sugerem que ALV003 pode atenuar a lesão da mucosa induzida pelo glúten em doentes celíacos que consumam quantidades moderadas de glúten (67).

Polímeros sequestradores de gliadina

BL-7010 (*BioLineRx, Ltd*) é um polímero que mostrou complexar a fração proteica do glúten em ambientes de pH semelhante ao pH gástrico e duodenal evitando assim, a formação de péptidos imunogénicos e o seu *uptake* para a LP (68). Um estudo *in vitro* com cultura de células intestinais concluiu que o BL-7010 é efetivo na ligação à gliadina, impedindo os efeitos tóxicos desta proteína nos enterócitos e a alteração da permeabilidade intestinal (69). Na avaliação da eficácia do BL-7010, num modelo de rato NOD-DQ8 concluiu-se que este evitou a alteração na proporção altura das vilosidades/profundidade das criptas, a linfocitose intra-epitelial e a permeabilidade intestinal paracelular. Adicionalmente não se verificaram interações deste polímero com enzimas digestivas e vitaminas nem a sua absorção sistémica, tendo sido bem-tolerado e considerado seguro (70). Concluiu-se que o uso de polímeros sequestradores de gliadina pode ser útil como terapêutica de suporte na DC quando a presença de glúten nos alimentos é desconhecida ou quando ocorre exposição em pequenas doses (69, 70).

Os resultados do único ensaio clínico desenvolvido sobre o uso destes polímeros não se encontram publicados (60).

4.2.2.2. Modulação da permeabilidade intestinal

Acetato de Larazotide

A bactéria *Vibrio cholerae* secreta uma toxina da *zonula occludens* (ZOT) que conduz à abertura das TJ epiteliais intestinais através de um recetor para a mesma. Quando expostos ao glúten os enterócitos na DC libertam a zonulina, uma proteína que atua de forma parácrina e com efeito semelhante à ZOT. O Acetato de Larazotide (AT-1001, *Alba Therapeutics*) é um octapéptido desenvolvido com homologia à ZOT e que atua bloqueando o recetor de ZOT/zonulina, protegendo desta forma a integridade das TJ (61).

Este composto mostrou, *in vitro*, prevenir a abertura das TJ induzida por múltiplos estímulos, incluindo fragmentos de glúten, inibindo a alteração da estrutura destas junções celulares, o recrutamento de macrófagos e o aumento na permeabilidade intestinal (71). Um ensaio clínico randomizado controlado com placebo de fase I demonstrou que este fármaco era seguro e bem tolerado nos doentes celíacos bem como a possibilidade deste reduzir a permeabilidade intestinal induzida por glúten (72). Lefler et al (2012) realizaram num ensaio clínico randomizado, duplamente-cego, incluindo 86 doentes que foram submetidos a uma prova com glúten. A eficácia deste fármaco foi avaliada através da comparação entre os grupos onde este foi administrado em doses de 0,25, 1, 4 e 8 mg com o grupo controlo tratado com placebo, durante 14 dias. Embora neste estudo não se tenham registado diferenças

estatisticamente significativas entre os grupos em relação à medida da permeabilidade intestinal, os sintomas GI nos grupos tratados com o fármaco foram menos graves que no grupo controlo, tendo sido a dose de 0,25 mg a mais eficaz (73). Segundo o ensaio dos autores Kelly et al. (2013) envolvendo 184 doentes no qual se avaliaram 3 grupos onde ocorreu administração do fármaco em doses de 1, 4 e 8 mg e um grupo de controlo com placebo, durante 6 semanas. Todos os indivíduos ingeriram diariamente uma quantidade estabelecida de glúten. À semelhança dos resultados de Lefler et al. (2012) não se verificou nenhum efeito estatisticamente significativo na medida da permeabilidade intestinal para qualquer dose do Acetato de Larazotide em comparação com o grupo controlo. Contudo, no grupo cuja dose era de 1mg, durante o estudo, a média do resultado da escala de avaliação dos sintomas GI permaneceu próximo do valor basal, sugerindo que não existiu qualquer aumento na sintomatologia GI induzida pelo glúten neste grupo. Por sua vez, a diferença entre o valor basal e a média do resultado da escala durante o tratamento com 1 mg de Acetato de Larazotide foi significativamente mais baixa que no grupo de controlo. À semelhança do estudo anterior, a dose mais baixa demonstrou maior eficácia. Após 6 semanas de prova com o glúten, os títulos de anti-tTG aumentaram em todos os grupos, contudo a proporção deste aumento foi significativamente menor nos 3 grupos tratados com o fármaco comparativamente ao grupo com placebo (74). Os resultados destes estudos demonstram que o Acetato de Larazotide não previne o aumento da permeabilidade intestinal, mas exerce proteção estatisticamente significativa quanto aos sintomas GI induzidos pelo glúten assim como benefício no aumento dos níveis de anticorpos, nas doses mais baixas usadas em estudo. Um ensaio clínico de fase II mais recente, envolvendo 342 doentes que mantiveram a DSG, nos quais a administração de Acetato de Larazotide (em 0,5, 1 e 2mg) foi comparada com um grupo placebo. Verificou-se que os indivíduos com sintomas persistentes que receberam 0,5 mg de Acetato de Larazotide registaram uma melhoria dos sinais e sintomas GI apesar da manutenção de uma DSG. Assim, os resultados deste estudo são consistentes com os estudos anteriores e sugerem que o tratamento com Acetato de Larazotide pode ser um tratamento adjuvante à DSG, prevenindo a recorrência ou persistência de sintomas em doentes com exposições inadvertidas ao glúten (71).

4.2.2.3. Atenuação da resposta imune adaptativa

Inibidores da tTG

A tTG desempenha um papel central na patogénese da DC. Inibidores desta enzima são possíveis fármacos para a DC, evitando a apresentação dos péptidos de gliadina pelo HLA-DQ2/DQ8 e atenuando a resposta inflamatória desenvolvida pelas células T (60). A cistamina, um inibidor competitivo da tTG, quando usada num estudo *ex vivo* com culturas de

tecido duodenal mostrou bloquear ou reduzir a resposta das células T contra os péptidos de gliadina desaminados (75). De forma semelhante, em culturas derivadas da mucosa do intestino delgado de doentes celíacos tratadas com outros inibidores da tTG, observou-se uma diminuição da densidade de células Treg ativadas, diminuição da hiperplasia de criptas epiteliais e manutenção de indicadores da presença de uma barreira intestinal íntata. Contudo, a inibição da enzima não conseguiu diminuir a infiltração de linfócitos TCD8⁺ intra-epiteliais, a apoptose dos enterócitos ou a secreção de auto-anticorpos dirigidos para a tTG no meio de cultura. A falta de especificidade tecidual destes inibidores da tTG constitui um problema, dado o risco de causarem efeitos laterais quando administrados *in vivo*. Novos fármacos devem ser desenvolvidos para uma libertação exclusiva no sistema GI ou com ação seletiva localmente no intestino delgado (76).

Bloqueio do HLA

O bloqueio da apresentação dos péptidos de gliadina pelo HLA-DQ2/DQ8 representa uma opção apelativa para a redução da resposta imune. Com base nos péptidos de gliadina que conduzem à resposta inflamatória, encontram-se em desenvolvimento diversos péptidos com alta afinidade para o HLA-DQ2 que quando complexados não são reconhecidos pelas células TCD4⁺ (61, 77). Para que esta estratégia seja eficaz é necessário que os péptidos desenvolvidos apresentem elevada afinidade para o HLA-DQ2 de modo a que possam competir com a ligação dos péptidos de glúten (77). Diversos péptidos bloqueadores analisados *in vitro*, mostraram apresentar uma elevada afinidade para o HLA-DQ2 em relação à fração proteica do glúten bem como minimização da resposta imune induzida pela gliadina (78, 79).

A incerteza do modo como os péptidos de gliadina alcançam a LP coloca dúvidas sobre a apetência dos péptidos modificados em competir com os péptidos de gliadina do lúmen e alcançarem as células-alvo. Por outro lado, desconhece-se a segurança destes péptidos alterados, nomeadamente quanto a efeitos laterais como imunossupressão e respostas de hipersensibilidade. Assim, é necessário o desenvolvimento de compostos altamente específicos, com alta afinidade, não tóxicos e não imunogénicos antes da sua aplicação em humanos (61).

4.2.2.4. Moduladores da resposta imune

Infeção por parasitas

A «hipótese da higiene» propõe que o aumento da prevalência das DAI e doenças alérgicas nos países desenvolvidos se possa dever à diminuição de incidência de doenças infecciosas. Deste modo, apesar de serem considerados patogénicos, os parasitas foram

propostos como opção terapêutica em condições deste tipo. *Necator americanus* é um nematodo GI antropofílico que quando inoculado em pequenas doses é bem tolerado (80). Tendo em conta estes fatores, realizaram-se ensaios clínicos para avaliar a capacidade deste parasita reduzir os efeitos imunotóxicos do glúten na DC. Um ensaio clínico prospectivo, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo envolveu 20 doentes que foram submetidos a inoculações pelo parasita ou placebo às 0 e 12 semanas. Na última semana do estudo realizaram uma prova com glúten, com administração de 16g de glúten diariamente durante 5 dias. Os parâmetros clínicos avaliados incluíram alterações histológicas da biópsia duodenal categorizadas pelo score Marsh, diferença nos níveis de IFN- γ antes e após prova com glúten e resposta clínica. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas no score Marsh, na secreção de IFN- γ pelas células T específicas e na frequência de sintomas GI entre os grupos. A contagem de LIE CD3⁺ e CD8⁺ estava aumentada em ambos grupos e uma acentuada diminuição, porém idêntica, na proporção altura das vilosidades intestinais/profundidade das criptas foi observada nos dois grupos. Os autores concluíram que a infeção por este nemátodo isoladamente não exclui a necessidade de realizar uma DSG (80).

Vacinação

A DC pode ser vista como uma condição em que ocorre perda dos mecanismos imunorreguladores que garantem que respostas imunes às proteínas da dieta não ocorram. O restabelecimento da tolerância oral ao glúten constitui uma opção terapêutica atrativa pelo que uma vacina de desensibilização ao glúten, Nexvax2® (*ImmusanT*), encontra-se em desenvolvimento (81). O objetivo deste tratamento é alterar a resposta pró-inflamatória das células T para uma resposta reguladora. Três péptidos imunogénicos de 16-mer derivados de gliadinas e hordeína que contabilizam cerca de 60% dos antígenos responsáveis pela resposta das células T foram identificados e estudados num murino TCR/DQ2 transgénico. Estes péptidos foram administrados via subcutânea e induziram uma tolerância a estes péptidos no modelo, através da supressão da proliferação das células TCD4⁺ e da produção de IL-2 e IFN- γ bem como aumento da expressão de células T reguladoras. No ensaio clínico de fase I, indivíduos HLA-DQ2 positivos receberam injeções subcutâneas com diferentes doses desta vacina. Os grupos sujeitos a maiores doses apresentaram sintomas GI semelhantes aos sintomas GI relacionados com a exposição ao glúten, confirmando que os péptidos na formulação da vacina incluem péptidos-chave na indução da resposta imune. Contudo, o perfil de segurança da vacina foi considerado aceitável, estando o ensaio clínico de fase II em desenvolvimento (81, 82).

Probióticos

Diversos estudos encontraram desequilíbrios na microbiota intestinal dos doentes celíacos, nomeadamente a sua composição anormal caracterizada por uma diminuição do número de espécies do género *Bifidobacterium* e um aumento do género *Bacteroides*. Esta disbiose parece não recuperar completamente após o início de uma DSG e normalização da morfologia da mucosa intestinal. Resultados de estudos realizados *in vitro* mostraram que alguns probióticos tinham a capacidade de degradar os péptidos de glúten em péptidos menos imunogénicos, proteger os enterócitos da lesão celular induzida pela gliadina, diminuir a inflamação e manter a permeabilidade intestinal (83). Smecuol et al (2013) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo com 22 doentes que foram tratados com *Bifidobacterium infantis* e realizaram uma dieta com glúten. No final do estudo observou-se uma melhoria subjetiva dos sintomas e uma diminuição dos títulos de anticorpos no grupo de tratamento, porém não se obteve nenhum efeito na melhoria da função barreira intestinal e o estado pró-inflamatório nas biópsias persistiu em ambos os grupos (84).

4.2.2.5. Controlo da resposta imune

A supressão da resposta inflamatória pelas células T constitui outra das opções investigadas como alternativa no tratamento da DC. Dada a resposta imune que caracteriza a DC, agentes que suprimam a atividade das citocinas inflamatórias ou que amplifiquem a atividade reguladora constituem potenciais terapêuticas. As terapêuticas imunossupressoras são usadas na DCR pelo que a aplicabilidade destes agentes na DC encontra-se sob investigação (60).

Bloqueio da migração de células T

Os linfócitos T efetores e de memória residem no epitélio do intestino delgado através da expressão do recetor de quimiocinas CCR9 e da molécula de adesão integrina $\alpha E\beta 7$. Desta forma, a ligação do CCR9 ao ligando CCL25 e da integrina ao MAdCAM1, expressos pelos enterócitos no intestino delgado, permite a localização destes linfócitos no compartimento epitelial. O bloqueio do CCR9 pelo antagonista seletivo Vercirnon (*ChemoCentrix*) e da integrina $\alpha E\beta 7$ pelo anticorpo monoclonal vedolizumab (*Entyvio*) têm sido estudados como opções terapêuticas na DII e na DC. Relativamente ao primeiro, foi completado um ensaio clínico de fase II na DC iniciado em 2007, cujos resultados não são conhecidos (62). Embora os primeiros estudos sobre o efeito do Vercirnon na DII tenham verificado alguma eficácia, estes resultados não se confirmaram num ensaio clínico de fase III mais recente (85). O MAdCAM-1 que permite a ligação com a integrina $\alpha 4\beta$ na mucosa intestinal e que se encontra regulado positivamente nos doentes com DC ativa, também constitui um alvo terapêutico.

Vedolizumab, um anticorpo monoclonal humanizado mostrou ser eficaz na Doença de Crohn em ensaios clínicos realizados, contudo não existem estudos planejados sobre o efeito deste agente na DC (62, 86).

Corticosteroides

Os corticosteroides em monoterapia ou em combinação com outros imunossuppressores são usados na DCR, contudo o seu uso é limitado devido aos seus efeitos laterais sistêmicos. Assim, os corticosteroides tópicos devido à sua baixa biodisponibilidade e atividade imunossupressora no intestino são opções no tratamento de doentes fracamente responsivos ou com doença refratária (87). O budenosido é um corticosteroide sintético, cuja forma de libertação controlada no intestino apresenta estas características, porém o seu uso em ensaios clínicos controlados na DC não foi validado. Ao ser um fármaco que tem como alvo a porção distal do intestino delgado e o colón, não existem fortes justificações para o seu uso numa doença que afeta predominantemente o intestino delgado proximal (87, 88). Ciacci et al (2009) estudaram a eficácia terapêutica do budenosido numa fase precoce da DC *in vitro* e *in vivo*, observando a sua capacidade de diminuir a resposta inflamatória ao glúten *in vitro* e melhoria de parâmetros clínicos nos doentes que realizaram tratamento, concluindo assim que em casos selecionados, o budenosido pode auxiliar na obtenção de uma melhoria sintomática superior e mais rápida quando adicionado a uma DSG (88). Estudos realizados na DCR verificaram também um benefício clínico, contudo sem melhoria na histologia da biópsia duodenal, o que se pode dever ao local de atuação mais distal do fármaco ou ao atraso que ocorre entre a resposta clínica e a melhoria morfológica nas biópsias intestinais (87, 89). Shalimar et al (2012) realizaram um estudo piloto randomizado em que adicionaram à DSG, 1 mg de prednisolona oral durante 4 semanas, concluindo que esta suprimiu a apoptose de enterócitos mas agravou a regeneração epitelial, pelo que na DC devem ser feitos curtos períodos de tratamento com este corticosteroide (90).

Anticorpos monoclonais contra TNF- α

A resposta Th1 desenvolvida na LP conduz à produção de citocinas como IFN- γ e TNF α , que estimulam a produção de metaloproteinases que contribuem para a destruição da MEC. Deste modo, à semelhança do que acontece na Doença de Crohn, coloca-se a hipótese de que o anti-TNF induz a apoptose dos linfócitos, reduzindo os infiltrados linfocitários, erradicando a *drive* inflamatória. Embora o efeito do infliximab, um anticorpo monoclonal anti-TNF, tenha sido investigado na Doença Inflamatória Intestinal (DII), na DC a literatura disponível limita-se a quatro *case reports*, onde foi usado como terapêutica na DCR, ocorrendo uma melhoria histológica nestes doentes. Ensaaios clínicos de maior escala são necessários para avaliar a utilidade clínica de anticorpos anti-TNF na DC (91-94).

Anticorpos monoclonais contra IFN- γ

O IFN- γ é uma das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células TCD4⁺ em resposta ao glúten, sendo que o seu bloqueio pode atenuar a ativação da cascata inflamatória e a destruição arquitetural da mucosa. O anticorpo anti- IFN- γ , fontolizumab, foi desenvolvido para o tratamento da DII, sendo tolerado pelos doentes, mas apresentou eficácia limitada. O desenvolvimento desta terapêutica cessou e ensaios clínicos sobre o seu uso na DC não foram planeados (82).

Anticorpos monoclonais anti-CD3

Os anticorpos anti-CD3 têm como alvo o complexo proteico CD3, um co-recetor do TCR, necessário para a expressão superficial deste último. A ação terapêutica anti-CD3 passa pela eliminação das células T efetoras e indução de células Treg, representando um papel benéfico nesta doença. Contudo, as células T efetoras na DC ativa tornam-se resistentes à supressão pelas células Treg. O perfil de efeitos laterais tornam esta terapêutica questionável e de difícil aplicabilidade (52, 53, 62).

Anticorpos monoclonais anti-CD20

Terapêuticas que tenham como alvo as células B específicas da doença também têm relevância. A depleção de células B com tratamento com anti-CD20 mostrou benefício clínico em diversas DAI, uma vez que através da apresentação de antígenos específicos às células T, os linfócitos B atuam como amplificadoras da resposta imune. Na DC, células B específicas para o glúten e para a tTG têm a capacidade de apresentarem os péptidos de gliadina às células T, tornando o CD20 um potencial alvo terapêutico (33, 95). Palazzo et al (2012) e Nikiphorou et al (2012) descreveram dois casos de DC acompanhada de artrite e Síndrome de Sjögren, respetivamente, em que os sintomas GI e extra digestivos eram resistentes à DSG e a outra imunoterapia. Com o uso de rituximab, um anticorpo monoclonal anti-CD20, registou-se uma melhoria clínica nos sintomas GI e extra-intestinais, com diminuição dos títulos de anticorpos IgA anti-tTG. No caso relatado por Palazzo et al (2012) foram obtidas biópsias intestinais antes e após o tratamento, que mantiveram a atrofia subtotal das vilosidades e linfocitose CD3⁺ CD8⁺ sem células aberrantes, que podem ser explicadas pela ausência de adesão a uma DSG por parte do doente (95, 96). Por outro lado, um estudo demonstrou que os anticorpos anti-CD20 são incapazes de reverter a geração de plasmócitos produtores de IgA na mucosa intestinal apesar da depleção de linfócitos B periféricos(97). Consequentemente, o papel terapêutico anti-CD20 permanece incerto e o seu uso na DC ainda não foi avaliado em estudos clínicos (82).

Antagonistas da IL-15

A citocina pró-inflamatória IL-15 tem um papel crítico na destruição tecidual imuno-mediada que ocorre na DC. A sua influência na proliferação dos linfócitos TCD8⁺, na estimulação das suas funções efectoras e na resistência dos mesmos à apoptose, favorece a inflamação crônica. Face a estas características, o antagonismo da IL-15 constitui uma abordagem terapêutica de interesse na DC (98). Yokoyama et al (2009) usaram um modelo de rato transgênico, que expressava IL-15 humana nos enterócitos e como consequência desenvolveu atrofia das vilosidades no intestino delgado. A partir deste estudaram os efeitos do anticorpo dirigido contra o CD122, um dos componentes do recetor celular da IL-15, bloqueando assim a sinalização intracelular da IL-15. O bloqueio desta citocina permitiu reverter as lesões imunopatológicas presentes no intestino delgado proximal (98). Mais recentemente, os mesmos autores usando o mesmo modelo animal, estudaram os efeitos do Tofacitinib, um inibidor não-específico da proteína JAK (envolvida na via de sinalização do recetor da IL-15). À semelhança do primeiro estudo, também verificaram uma reversão na inflamação intestinal do modelo (99). Atualmente um ensaio clínico de fase I encontra-se a ser desenvolvido usando um anticorpo monoclonal humanizado contra o CD22 na DCR (60).

5. Conclusão

A DC é uma doença inflamatória crónica induzida pelo glúten cuja prevalência tem aumentado ao longo dos últimos anos. Atualmente a única terapêutica aprovada é a realização de uma DSG, que se revela de carácter restritivo e exige uma elevada *compliance* o que limita a adesão e tem repercussões na qualidade de vida dos doentes. Apesar da segurança deste tratamento e de se obter uma melhoria clínica bem como dos parâmetros laboratoriais, a remissão completa das lesões induzidas pela inflamação na mucosa intestinal não é atingida num grande número de doentes em tratamento. Esta lesão permanente associa-se a um risco de mortalidade e morbilidade aumentado devido ao desenvolvimento de complicações da DC. Encontram-se igualmente em risco os doentes com doença celíaca refratária, nos quais os sintomas e alterações histológicas não regredem, os doentes que não aderem a uma DSG ou sofrem exposições inadvertidas por alimentos contaminados com glúten.

Perante as limitações do único tratamento disponível há a necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas que permitam a realização de uma dieta não restritiva, a resolução completa da inflamação intestinal e a remissão dos sintomas bem como o desenvolvimento de terapêuticas adjuvantes à dieta sem glúten que possibilitem a exposição a quantidades moderadas de glúten sem efeitos deletérios para o doente. Avanços no conhecimento da fisiopatologia desta doença permitiram a identificação de diversos alvos terapêuticos. Contudo, ainda existem incertezas relativas a alguns mecanismos da doença e ao significado de certas alterações patológicas, cujo esclarecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Quanto às terapêuticas não dietéticas desenvolvidas ao longo dos últimos anos, verificam-se alguns resultados promissores, relativamente ao uso de proteases orais que previnam a exposição da mucosa ao glúten e ao uso de moduladores da permeabilidade intestinal, principalmente como terapêuticas adjuvantes à DSG.

A maioria dos estudos clínicos que envolvem novas terapêuticas encontram-se em fase pré-clínica ou em fase I e II dos ensaios clínicos, pelo que são necessários mais estudos que incluam um maior número de doentes, de modo a avaliar a sua segurança e eficácia, para que possam vir a ser aplicáveis na prática clínica. Terapêuticas imunossupressoras com corticosteroides e anticorpos monoclonais demonstraram ser eficazes no controlo da sintomatologia e da inflamação em casos graves, refratários à DSG. Porém, também estas estratégias terapêuticas carecem de estudos específicos na doença celíaca e de ensaios clínicos de larga escala.

Deste modo, conclui-se que foram feitos progressos no desenvolvimento de potenciais alternativas à DSG, contudo esta permanecerá como o único tratamento a ser adotado aquando do diagnóstico até que mais estudos sejam realizados e revelem novas opções terapêuticas igualmente efetivas e seguras.

6. Referências Bibliográficas

1. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet*. 2009;373(9673):1480-93.
2. Lionetti E, Gatti S, Pulvirenti A, Catassi C. Celiac disease from a global perspective. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(3):365-79.
3. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet*. 2003;362(9381):383-91.
4. Rubio-Tapia A, Murray JA. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(2):116-22.
5. Green PH, Lebowitz B, Greywoode R. Celiac disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1099-106; quiz 107.
6. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1912-33.
7. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1981-2002.
8. Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008;7(8):644-50.
9. Shaoul R, Lerner A. Associated autoantibodies in celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2007;6(8):559-65.
10. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *Biomed Res Int*. 2013;2013:127589.
11. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA, American College of G. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76; quiz 77.
12. Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology*. 2005;128(4 Suppl 1):S79-86.
13. Olen O, Askling J, Ludvigsson JF, Hildebrand H, Ekbom A, Smedby KE. Coeliac disease characteristics, compliance to a gluten free diet and risk of lymphoma by subtype. *Dig Liver Dis*. 2011;43(11):862-8.
14. Elli L, Contiero P, Tagliabue G, Tomba C, Bardella MT. Risk of intestinal lymphoma in undiagnosed coeliac disease: results from a registered population with different coeliac disease prevalence. *Dig Liver Dis*. 2012;44(9):743-7.
15. Saturni L, Ferretti G, Bacchetti T. The gluten-free diet: safety and nutritional quality. *Nutrients*. 2010;2(1):16-34.
16. Rubio-Tapia A, Rahim MW, See JA, Lahr BD, Wu TT, Murray JA. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(6):1412-20.
17. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, Mora A, Bertolazzi S, Turini D, et al. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;29(12):1299-308.
18. Hall NJ, Rubin G, Charnock A. Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(4):315-30.
19. van Gils T, Nijeboer P, van Wanrooij RL, Bouma G, Mulder CJ. Mechanisms and management of refractory coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(10):572-9.
20. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(1):160-6.
21. Lee A, Newman JM. Celiac diet: its impact on quality of life. *J Am Diet Assoc*. 2003;103(11):1533-5.
22. Nachman F, del Campo MP, Gonzalez A, Corzo L, Vazquez H, Sfoggia C, et al. Long-term deterioration of quality of life in adult patients with celiac disease is associated with treatment noncompliance. *Dig Liver Dis*. 2010;42(10):685-91.
23. McAllister CS, Kagnoff MF. The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):581-600.
24. McCarville JL, Caminero A, Verdu EF. Pharmacological approaches in celiac disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;25:7-12.
25. Bakshi A, Stephen S, Borum ML, Doman DB. Emerging therapeutic options for celiac disease: potential alternatives to a gluten-free diet. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2012;8(9):582-8.

26. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. 2003;52(2):218-23.
27. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41(4):408-19.
28. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008;135(1):194-204 e3.
29. Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D. Pathomechanisms in celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;132(2):98-108.
30. Klock C, Diraimondo TR, Khosla C. Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):513-22.
31. Cardoso I, Stamnaes J, Andersen JT, Melino G, Iversen R, Sollid LM. Transglutaminase 2 interactions with extracellular matrix proteins as probed with celiac disease autoantibodies. *FEBS J*. 2015;282(11):2063-75.
32. Sollid LM, Jabri B. Celiac disease and transglutaminase 2: a model for posttranslational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(6):732-8.
33. Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):746-53.
34. Lindfors K, Maki M, Kaukinen K. Transglutaminase 2-targeted autoantibodies in celiac disease: Pathogenetic players in addition to diagnostic tools? *Autoimmun Rev*. 2010;9(11):744-9.
35. Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, Sjostrom H. Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1690(3):220-30.
36. Diosdado B, Wijmenga C. Molecular mechanisms of the adaptive, innate and regulatory immune responses in the intestinal mucosa of celiac disease patients. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(5):681-700.
37. Qiao SW, Iversen R, Raki M, Sollid LM. The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):523-40.
38. Sollid LM, Iversen R, Steinsbo O, Qiao SW, Bergseng E, Dorum S, et al. Small bowel, celiac disease and adaptive immunity. *Dig Dis*. 2015;33(2):115-21.
39. Mazzarella G. Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(24):7349-56.
40. Brottveit M, Beitnes AC, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen FE, et al. Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):842-50.
41. Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):551-66.
42. Gianfrani C, Troncone R, Mugione P, Cosentini E, De Pascale M, Faruolo C, et al. Celiac disease association with CD8+ T cell responses: identification of a novel gliadin-derived HLA-A2-restricted epitope. *J Immunol*. 2003;170(5):2719-26.
43. Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E, Marano C, et al. Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. *Gastroenterology*. 2008;134(4):1017-27.
44. Han A, Newell EW, Glanville J, Fernandez-Becker N, Khosla C, Chien YH, et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells and gammadelta T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(32):13073-8.
45. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(12):858-70.
46. Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2012;22(4):639-60.
47. Pagliari D, Cianci R, Frosali S, Landolfi R, Cammarota G, Newton EE, et al. The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: a bridge between innate and adaptive immune response. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(5):455-66.
48. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev*. 2014;260(1):221-34.

49. du Pre MF, Sollid LM. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015;29(3):413-23.
50. Borrelli M, Salvati VM, Maglio M, Zanzi D, Ferrara K, Santagata S, et al. Immunoregulatory pathways are active in the small intestinal mucosa of patients with potential celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(11):1775-84.
51. Granzotto M, dal Bo S, Quaglia S, Tommasini A, Piscianz E, Valencic E, et al. Regulatory T-cell function is impaired in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2009;54(7):1513-9.
52. Hmida NB, Ben Ahmed M, Moussa A, Rejeb MB, Said Y, Kourda N, et al. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in celiac disease? *Am J Gastroenterol.* 2012;107(4):604-11.
53. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, Iaffaldano L, Iaquinio G, Giardullo N, et al. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(7):1308-17.
54. Murray JA, Watson T, Clearman B, Mitros F. Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(4):669-73.
55. Bardella MT, Velio P, Cesana BM, Prampolini L, Casella G, Di Bella C, et al. Coeliac disease: a histological follow-up study. *Histopathology.* 2007;50(4):465-71.
56. Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, et al. Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(7):753-8.
57. Galli G, Esposito G, Lahner E, Piloizzi E, Corleto VD, Di Giulio E, et al. Histological recovery and gluten-free diet adherence: a prospective 1-year follow-up study of adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(6):639-47.
58. Shepherd SJ, Gibson PR. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *J Hum Nutr Diet.* 2013;26(4):349-58.
59. Crespo Perez L, Castillejo de Villasante G, Cano Ruiz A, Leon F. Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. *Eur J Intern Med.* 2012;23(1):9-14.
60. Veeraghavan G, Leffler DA, Kaswala DH, Mukherjee R. Celiac disease 2015 update: new therapies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(7):913-27.
61. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 2000;119(1):234-42.
62. Plugis NM, Khosla C. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015;29(3):503-21.
63. Wieser H, Koehler P. Detoxification of gluten by means of enzymatic treatment. *J AOAC Int.* 2012;95(2):356-63.
64. Tack GJ, van de Water JM, Bruins MJ, Kooy-Winkelaar EM, van Bergen J, Bonnet P, et al. Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. *World J Gastroenterol.* 2013;19(35):5837-47.
65. Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology.* 2007;133(2):472-80.
66. Siegel M, Garber ME, Spencer AG, Botwick W, Kumar P, Williams RN, et al. Safety, tolerability, and activity of ALV003: results from two phase 1 single, escalating-dose clinical trials. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):440-50.
67. Lahdeaho ML, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova OP, Karja-Lahdensuu T, et al. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 2014;146(7):1649-58.
68. Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David CS, et al. The copolymer P(HEMA-co-SS) binds gluten and reduces immune response in gluten-sensitized mice and human tissues. *Gastroenterology.* 2012;142(2):316-25 e1-12.
69. Pinier M, Verdu EF, Nasser-Eddine M, David CS, Vezina A, Rivard N, et al. Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2009;136(1):288-98.
70. McCarville JL, Nisemblat Y, Galipeau HJ, Jury J, Tabakman R, Cohen A, et al. BL-7010 demonstrates specific binding to gliadin and reduces gluten-associated pathology in a chronic mouse model of gliadin sensitivity. *PLoS One.* 2014;9(11):e109972.
71. Leffler DA, Kelly CP, Green PH, Fedorak RN, DiMarino A, Perrow W, et al. Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: a randomized controlled trial. *Gastroenterology.* 2015;148(7):1311-9 e6.

72. Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(5):757-66.
73. Leffler DA, Kelly CP, Abdallah HZ, Colatrella AM, Harris LA, Leon F, et al. A randomized, double-blind study of larazotide acetate to prevent the activation of celiac disease during gluten challenge. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(10):1554-62.
74. Kelly CP, Green PH, Murray JA, Dimarino A, Colatrella A, Leffler DA, et al. Larazotide acetate in patients with coeliac disease undergoing a gluten challenge: a randomised placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(2):252-62.
75. Sulic AM, Kurppa K, Rauhavirta T, Kaukinen K, Lindfors K. Transglutaminase as a therapeutic target for celiac disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(3):335-48.
76. Rauhavirta T, Oittinen M, Kivisto R, Mannisto PT, Garcia-Horsman JA, Wang Z, et al. Are transglutaminase 2 inhibitors able to reduce gliadin-induced toxicity related to celiac disease? A proof-of-concept study. *J Clin Immunol.* 2013;33(1):134-42.
77. Kapoerchan VV, Wiesner M, Hillaert U, Drijfhout JW, Overhand M, Alard P, et al. Design, synthesis and evaluation of high-affinity binders for the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Mol Immunol.* 2010;47(5):1091-7.
78. Xia J, Bergseng E, Fleckenstein B, Siegel M, Kim CY, Khosla C, et al. Cyclic and dimeric gluten peptide analogues inhibiting DQ2-mediated antigen presentation in celiac disease. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(20):6565-73.
79. Juse U, van de Wal Y, Koning F, Sollid LM, Fleckenstein B. Design of new high-affinity peptide ligands for human leukocyte antigen-DQ2 using a positional scanning peptide library. *Hum Immunol.* 2010;71(5):475-81.
80. Daveson AJ, Jones DM, Gaze S, McSorley H, Clouston A, Pascoe A, et al. Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease--a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS One.* 2011;6(3):e17366.
81. Rossi M. Vaccination and other antigen-specific immunomodulatory strategies in celiac disease. *Dig Dis.* 2015;33(2):282-9.
82. Mukherjee R, Kelly CP, Schuppan D. Nondietary therapies for celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;22(4):811-31.
83. de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, Gouveia Peluzio Mdo C. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):482-9.
84. Smecuol E, Hwang HJ, Sugai E, Corso L, Chernavsky AC, Bellavite FP, et al. Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of *Bifidobacterium infantis* naten life start strain super strain in active celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(2):139-47.
85. Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Lee SD, Allez M, Fedorak RN, et al. Randomised clinical trial: vercirnon, an oral CCR9 antagonist, vs. placebo as induction therapy in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(10):1170-81.
86. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2013;369(8):711-21.
87. Brar P, Lee S, Lewis S, Egbuna I, Bhagat G, Green PH. Budesonide in the treatment of refractory celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(10):2265-9.
88. Ciacci C, Maiuri L, Russo I, Tortora R, Bucci C, Cappello C, et al. Efficacy of budesonide therapy in the early phase of treatment of adult coeliac disease patients with malabsorption: an in vivo/in vitro pilot study. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(12):1170-6.
89. Daum S, Ipczynski R, Heine B, Schulzke JD, Zeitz M, Ullrich R. Therapy with budesonide in patients with refractory sprue. *Digestion.* 2006;73(1):60-8.
90. Shalimar, Das P, Sreenivas V, Datta Gupta S, Panda SK, Makharia GK. Effect of addition of short course of prednisolone to gluten-free diet on mucosal epithelial cell regeneration and apoptosis in celiac disease: a pilot randomized controlled trial. *Dig Dis Sci.* 2012;57(12):3116-25.
91. Chaudhary R, Ghosh S. Infliximab in refractory coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17(6):603-4.
92. Costantino G, della Torre A, Lo Presti MA, Caruso R, Mazzon E, Fries W. Treatment of life-threatening type I refractory coeliac disease with long-term infliximab. *Dig Liver Dis.* 2008;40(1):74-7.

93. Gillett HR, Arnott ID, McIntyre M, Campbell S, Dahele A, Priest M, et al. Successful infliximab treatment for steroid-refractory celiac disease: a case report. *Gastroenterology*. 2002;122(3):800-5.
94. Rawal N, Twaddell W, Fasano A, Blanchard S, Safta A. Remission of Refractory Celiac Disease With Infliximab in a Pediatric Patient. *ACG Case Rep J*. 2015;2(2):121-3.
95. Nikiphorou E, Hall FC. First report of improvement of coeliac disease in a patient with Sjogren's syndrome treated with rituximab. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(10):1906-7.
96. Palazzo C, Nicaise-Roland P, Palazzo E. Rituximab: an effective treatment for rheumatologic and digestive symptoms of celiac disease? *Joint Bone Spine*. 2012;79(4):422-3.
97. Mei HE, Frolich D, Giesecke C, Loddenkemper C, Reiter K, Schmidt S, et al. Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab. *Blood*. 2010;116(24):5181-90.
98. Yokoyama S, Watanabe N, Sato N, Perera PY, Filkoski L, Tanaka T, et al. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15849-54.
99. Yokoyama S, Perera PY, Waldmann TA, Hiroi T, Perera LP. Tofacitinib, a janus kinase inhibitor demonstrates efficacy in an IL-15 transgenic mouse model that recapitulates pathologic manifestations of celiac disease. *J Clin Immunol*. 2013;33(3):586-94.